绿僵菌素 A 和 B 对斜纹夜蛾 SL-1 细胞的增殖抑制和致凋亡作用

孟 翔，胡俊杰，金丰良，任顺祥*
（华南农业大学资源环境学院/生物防治教育部工程研究中心，广州 510642）

摘要：绿僵菌素 A 和 B 是生物活性分子，本研究用 MTT 法、相差显微观察、荧光倒置显微观察和流式细胞术比较了绿僵菌素 A 和 B 对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* SL-1 细胞的毒杀作用。结果表明：绿僵菌素 A 和 B 对 SL-1 细胞均具有明显的增殖抑制作用，且具有正比的时间-浓度-效应关系，绿僵菌素 A 和 B 处理细胞 48 h 后的 IC_{50} 值分别为 7.80 和 20.73 μg/mL。倒置相差显微观察发现，绿僵菌素 A 和 B 可以引起 SL-1 细胞变圆、胞膜收缩、有凋亡小颗粒形成。随着时间的延长，细胞悬浮致死并出现大量空泡和胞质外泄现象。但是在同样的处理浓度下，绿僵菌素 A 的作用较绿僵菌素 B 明显。用 AO/EB 染色后，荧光显微观察发现：绿僵菌素 A 诱导的细胞荧光强度高于绿僵菌素 B。流式细胞仪检测结果表明：绿僵菌素 A 和 B 对 SL-1 细胞具有明显的致凋亡作用。10 μg/mL 绿僵菌素 A 和 B 作用细胞 48 h 后，SL-1 细胞的总凋亡率分别达 78.88% ± 0.97% 和 72.23% ± 2.29%。本研究从细胞水平肯定了绿僵菌素具有良好的增殖抑制和致凋亡作用，并且为它在害虫防治中的潜在应用提供了一些理论支持。

关键词：斜纹夜蛾；绿僵菌素 A；绿僵菌素 B；SL-1 细胞；细胞增殖；凋亡
中图分类号：Q965.9 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2011)09-1003-07

Inhibition of cellular proliferation and apoptosis in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) SL-1 cells induced by destruxin A and destruxin B

MENG Xiang, HU Jun-Jie, JIN Feng-Liang, REN Shun-Xiang* (College of Natural Resources and Environments, South China Agricultural University/Engineering Research Center of Biocontrol, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Both destruxin A and destruxin B are bioactive molecules. In the present study, the effects of the two destruxins (destruxin A and destruxin B) on *Spodoptera litura* SL-1 cells were compared with MTT assay, inverted phase contrast microscope (IPCM), fluorescence microscopy (FM) and flow cytometry (FCM) technologies. The results showed that both destruxins had an apparent effect on inhibition of cellular proliferation, and they had a positive relationship of time-concentration-efficacy. The IC_{50} values were 7.80 and 20.73 μg/mL at 48 h after treatment with destruxin A and destruxin B, respectively. With inverted phase contrast microscopy observation, we found that both destruxins could cause cell rounded, celluar membrane shrunk, and apoptotic bodies formed. Most of cells were suspended and dead as vacuoles appeared and cytoplasm leaked out with extension of the treatment time. However, under the same concentrations tested, destruxin A showed stronger effect than destruxin B. With fluorescence microscopy observation after AO/EB staining, a relative higher fluorescent intensity of the cells induced by destruxin A was found as compared with destruxin B. Observations by flow cytometer showed that destruxin A and destruxin B could induce apoptosis in SL-1 cells, and the total apoptotic rates reached 78.88% ± 0.97% and 72.23% ± 2.29% at 48 h after treatment with 10 μg/mL destruxin A and destruxin B, respectively. This research demonstrated that destruxins possess a preferable activity for cell proliferation and apoptosis at the cellular level, and provided some theoretical support for their potential application in pest control.

Key words: *Spodoptera litura*; destruxin A; destruxin B; SL-1 cell; cellular proliferation; apoptosis

绿僵菌素(destruxin, dtx)又称破坏素，是一种 具有昆虫免疫抑制活性的真菌毒素，属环缩肽类化

基金项目：国家自然科学基金项目(31071685；30800718)
作者简介：孟翔，女，1982 年生，山西太谷人，博士研究生，研究方向为昆虫毒理，E-mail：mengxiangxs@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, Tel.: 020-85288313; E-mail: rensxcn@yahoo.com.cn
收稿日期 Received: 2011-01-31；接受日期 Accepted: 2011-08-22

合物，是金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*、座壳孢 *Aschersonia* sp.、芸苔链格孢 *Alternaria brassicae* 和盘蛇孢 *Ophiosphaerella herpotricha* 等真菌分泌的胞外毒素(Strasser *et al*., 2000；Hinaje *et al*., 2002)，对鳞翅目、同翅目、双翅目、等翅目、直翅目和鞘翅目等20多种害虫有较强的毒杀和拒食作用，其抗病毒、抗肿瘤作用也有报道(Chen *et al*., 1997；Yoshimoto and Imoto, 2002)。现已分离鉴定出36种绿僵菌素同系物，其中绿僵菌素A，B和E 3种最为常见(Pedras *et al*., 2002)，且绿僵菌素A和B的含量和稳定性均高于绿僵菌素E(胡琼波和任顺祥，2004)。由于绿僵菌素种类及生物活性的多样性，使之可能成为我国虫生真菌研究和新型无公害农药开发的新热点。

绿僵菌素可以通过昆虫体表触杀、饲喂、注射等途径对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫、烟粉虱 *Bemisia tabaci* 若虫、大等鳃金龟 *Exolontha serrulata* 幼虫(蛴螬)、黄地老虎 *Agrotis segetum* 和大菜粉蝶 *Pieris brassicae* 初孵幼虫等具有毒杀作用(Thomsen and Eilenberg, 2000；胡琼波等，2007；Sree *et al*., 2008；Hu *et al*., 2009)。对云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* 的生长发育也有抑制作用(Brousseau *et al*., 1998)；受绿僵菌素处理的大蜡螟 *Galleria mellonella* 的马氏管和中肠结构发生改变(Dumas *et al*., 1996)；处理的斜纹夜蛾幼虫中肠、唾液腺、马氏管、脂肪体、和血细胞中过氧化氢酶的表达也有差异(Sree *et al*., 2010)。迄今，国内外研究以活虫为对象，在杀虫活性、器官和组织等方面对绿僵菌素的毒杀作用已进行了大量研究(胡琼波和任顺祥，2004；胡琼波等，2007)。但绿僵菌素作用昆虫细胞活性和作用机理研究尚不完善。为深入研究绿僵菌素在细胞水平的毒杀活性及作用机理，明确绿僵菌素A和B的活性差异，本研究以离体培养的斜纹夜蛾 *S. litura* SL-1细胞为对象，比较了绿僵菌素A和B对SL-1细胞增殖抑制作用和致凋亡作用，为绿僵菌素作用机制和开发应用的深入研究提供了依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

斜纹夜蛾 *Spodotera litura* SL-1细胞系，由华南农业大学胡美英老师惠赠，由华南农业大学生物防治教育部工程中心实验室传代培养。培养基为含10%胎牛血清的Grace's昆虫培养基(Gibco公司)在27℃下恒温培养。

绿僵菌素A(destruxin A, dtx-A)和B(destruxin B, dtx-B)系华南农业大学生物防治教育部工程中心虫生真菌实验室分离纯化(Hu *et al*., 2006)，并进行HPLC分析(Liu *et al*., 2004)，纯度分别为91.5%和93.1%；药剂用二甲基亚砜(DMSO)溶解，昆虫培养基稀释，并保持DMSO的终浓度为0.1%。

倒置相差显微镜(日本Nikon Eclipse Ti)；iMark酶标仪(美国Bio-Rad公司)；FACS Calibur流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)；超净工作台(AIRTECH苏州安泰空气技术有限公司)；细胞培养瓶，96孔板和6孔板(美国Corning Incorporation公司)；移液器(德国Eppendorf)。

1.2 MTT法检测绿僵菌素A和B对SL-1细胞的增殖抑制作用

采用MTT检测法(裴凤华等，2007)，选对数生长期的SL-1细胞，待细胞浓度为1×10^5个/mL时接种于96孔板，以2.5，5，10，20和40 μg/mL 5个浓度为绿僵菌素A和B处理，以0.1% DMSO的培养基为对照。每个处理重复5次。27℃恒温培养箱分别培养24和48 h，提前4 h每孔加入5 mg/mL MTT 20 μL，继续培养4 h后，弃上清，每孔分别加入DMSO 100 μL，振荡15 min后，取样Bio-Rad酶标仪测490 nm的OD值，计算细胞增殖抑制率和IC_{50}值。

细胞增殖抑制率(%)=(对照组OD均值-实验组OD均值)/对照组OD均值×100。

1.3 IPCM观察绿僵菌素A和B对SL-1细胞形态的影响

取对数生长期的SL-1细胞接种于6孔板，24 h贴壁后加10 μg/mL的绿僵菌素A和B，对照加0.1% DMSO培养基，分别于24和48 h后倒置相差显微镜下观察细胞的形态变化。

1.4 FM法观察绿僵菌素A和B对SL-1细胞凋亡的影响

采用吖啶橙-溴化乙锭(AO-EB)荧光双染法(汪承亚等，1998)，用PBS配制吖啶橙和溴化乙锭各100 μg/mL，染色前混合加入，取100 μL用10 μg/mL绿僵菌素A和绿僵菌素B处理48 h后的受检细胞悬液，各加入5 μL混合荧光染液，轻轻混匀，滴至载玻片上，加盖玻片后立即用荧光倒置显微镜观察。

1.5　FCM 法检测绿僵菌素 A 和 B 对 SL-1 细胞的凋亡作用

取对数生长期细胞接种于 6 孔板中，10 μg/mL 绿僵菌素 A 和绿僵菌素 B 处理细胞 48 h 后，收集细胞，参照 Invitrogen 凋亡试剂盒说明，用 PBS 洗涤细胞 2 次，用 100 μL Binding Buffer 重悬，加 5 μL FITC annexin V 和 10 μL PI，避光孵育 15 min，再加入 400 μL Binding Buffer，上流式细胞仪 Cell Quest 检测分析，每处理组设 3 次重复。

1.6　数据统计与分析

应用 DPS 9.50 统计学软件进行毒力回归和方差分析。用邓肯氏新复极差法（Duncan's multiple range test, DMRT）进行差异显著性分析。细胞凋亡检测用 Cell Quest 软件分析。

2　结果与分析

2.1　绿僵菌素 A 和 B 对 SL-1 细胞的增殖抑制

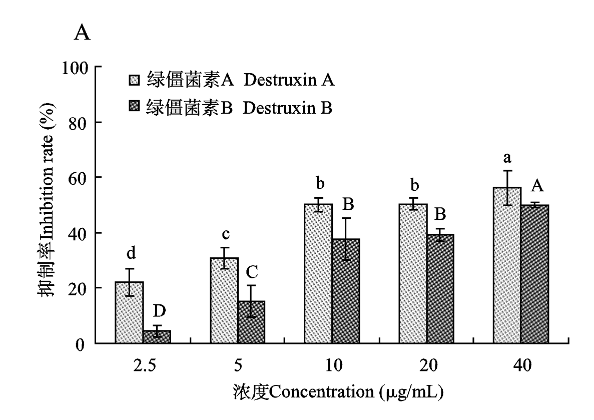
本实验应用 MTT 法比较了绿僵菌素 A 和 B 对 SL-1 细胞的增殖抑制作用。从图 1 可以看出，不同浓度绿僵菌素 A 和 B 作用 SL-1 细胞 24 和 48 h 后均有良好的增殖抑制作用，并随时间和浓度的增加呈正比的时间-浓度效应关系。绿僵菌素 A 和 B 处理 SL-1 细胞 48 h 后的 IC_{50} 值分别为 7.80 和 20.73 μg/mL（表 1）。统计结果表明，绿僵菌素 A 对细胞的抑制作用显著高于绿僵菌素 B（n=3, $P<0.05$）。

2.2　绿僵菌素 A 和 B 对 SL-1 细胞形态的影响

由图 2 可见，与对照相比，绿僵菌素 A 和 B 处理 SL-1 细胞 24 和 48 h 后，其形态发生显著变化。24 h 处理后，对照细胞呈梭形贴壁生长，细胞核均匀居于细胞质中央，细胞界限清晰，增殖正常（图 2：A）；绿僵菌素 A 处理的细胞增殖抑制明显，部分细胞膜收缩，细胞变圆，其上附有小颗粒体，且部分细胞内有空泡现象（图 2：B）；绿僵菌素 B 处理的细胞部分不规则生长，收缩现象不明显，细胞核清晰可见，细胞增殖延缓，但细胞内无空泡现象（图 2：C）。经 48 h 处理后，对照细胞正常对数增殖（图 2：D）；绿僵菌素 A 处理的细胞变圆膨大，细胞核膜损伤，空泡现象明显且部分细胞致死漂浮（图 2：E）；绿僵菌素 B 处理的细胞膜收缩，细胞变圆，细胞核膜损伤，并附有小颗粒体和空泡现象，与绿僵菌素 A 处理细胞 24 h 的情况相似（图 2：F）。

2.3　绿僵菌素 A 和 B 对 SL-1 细胞凋亡的影响

用 AO-EB 双荧光染色绿僵菌素 A 和 B 处理48 h



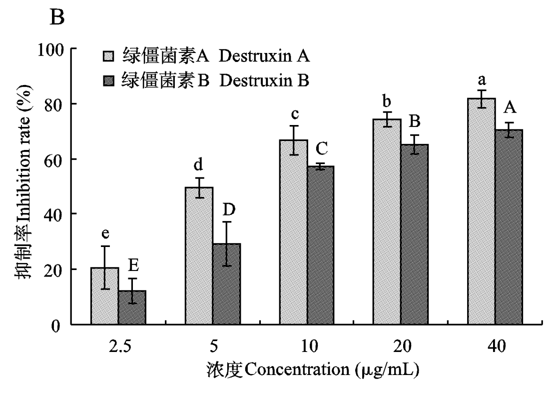


图 1　绿僵菌素 A 和 B 作用 SL-1 细胞 24 h（A）和 48 h（B）的浓度效应

Fig. 1　The concentration effect of destruxins A and B on SL-1 cells at 24 h (A) and 48 h (B) after treatment

柱上不同小写字母表示绿僵菌素 A 不同浓度处理在 0.05 水平上差异显著（n=3, $P<0.05$）；不同大写字母表示绿僵菌素 B 不同浓度处理在 0.05 水平上差异显著（n=3, $P<0.05$）。Different small letters above the pillars indicate significant difference among treatments with different concentrations of destruxin A at the 0.05 level. Different capital letters above the pillars indicate significant difference among treatments with different concentrations of destruxin B at the 0.05 level.

表 1　绿僵菌素 A 和 B 作用 SL-1 细胞 48 h 的增殖抑制作用比较

Table 1　Comparison of growth inhibition effect of destruxins A and B on SL-1 cells at 48 h after treatment

处理 Treatment	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 r Correlation coefficient	IC_{50} (μg/mL)
绿僵菌素 A Destruxin A	$Y=3.8430+1.3585X$	0.9517	7.80 a
绿僵菌素 B Destruxin B	$Y=1.8524+0.1518X$	0.9229	20.73 b

同列数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著；表 2 同。Different small letters following the data within a column indicate significant difference at the 0.05 level. The same for Table 2.

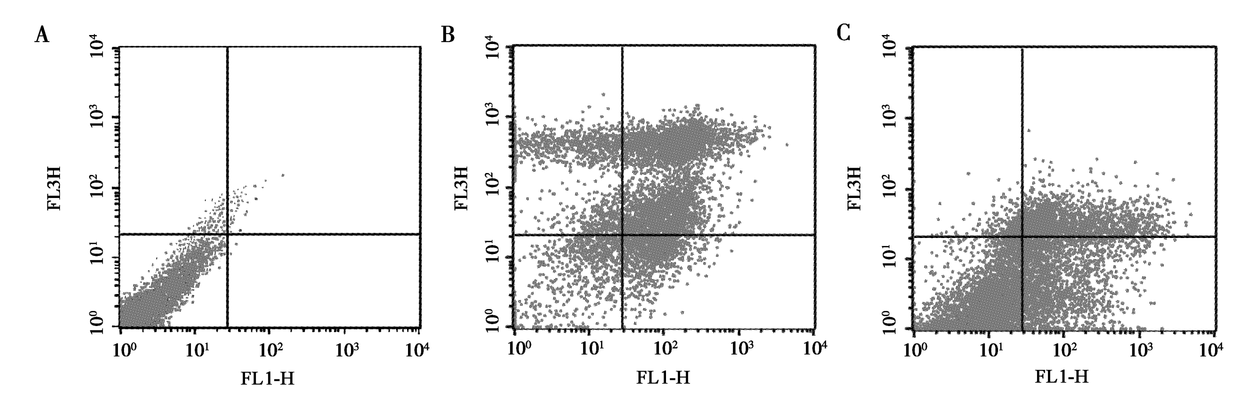


图 4　绿僵菌素 A 和绿僵菌素 B 对 SL-1 细胞的致凋亡作用

Fig. 4　Induced apoptosis in SL-1 cells by destruxins A and B

A：0.1% DMSO (CK)；B：10 μg/mL 绿僵菌素 A (Destruxin A, 10 μg/mL)；C：10 μg/mL 绿僵菌素 B (Destruxin B, 10 μg/mL). 左上象限 Left upper quadrant：坏死细胞 Necrotic cells；右上象限 Right upper quadrant：晚期凋亡细胞 Late apoptoic cells；左下象限 Left low quadrant：活细胞 Live cells；右下象限 Right low quadrant：早期凋亡细胞 Early apoptotic cells.

表 2　10 μg/mL 绿僵菌素 A 和 B 作用 48 h 的 SL-1 细胞凋亡率

Table 2　Apoptotic rate of SL-1 cells at 48 h after treatment with 10 μg/mL destruxins A and B

	早期凋亡率(%) Early apoptotic rate	晚期凋亡率(%) Late apoptotic rate	总凋亡率(%) Total apoptotic rate
0.1% DMSO (CK)	0.04 ±0.02 c	0.23 ±0.05 c	0.27 ±0.06 c
绿僵菌素 A Destruxin A	13.35 ±1.22 b	62.53 ±0.50 a	78.88 ±0.97 a
绿僵菌素 B Destruxin B	42.47 ±2.67 a	29.76 ±0.73 b	72.23 ±2.29 b

能引起部分致病效应并加快昆虫的致死进程(Sloman and Reynolds, 1993)，与绿僵菌素诱导昆虫细胞凋亡并造成昆虫致死有着密切的关系(Vey *et al.*, 2002)。在研究绿僵菌素对蛴螬的触杀活性实验中发现：绿僵菌素 A 和 B 对大等鳃金龟 *E. serrulata* 和卵圆齿爪鳃金龟 *Holotrichia ovata* 1 龄蛴螬均具有较强的触杀活性，且绿僵菌素 A 对这两种蛴螬的毒力均大于绿僵菌素 B(胡琼波等, 2007)。绿僵菌素对斜纹夜蛾的幼虫触杀活性实验中还发现，绿僵菌素对斜纹夜蛾的毒力随着浓度的增高而增加(Sree *et al.*, 2008)。本研究在离体细胞增殖抑制实验中同样发现绿僵菌素 A 和 B 对 SL-1 细胞均具有明显的增殖抑制作用，且呈正比的时间和浓度效应关系，其中，绿僵菌素 A 对细胞的影响明显高于绿僵菌素 B。这与活体昆虫实验的结果是一致的。可见绿僵菌素 A 和 B 对活体昆虫和细胞都具有毒杀活性，且绿僵菌素 A 的活性高于绿僵菌素 B。

绿僵菌素对细胞水平的影响可能主要是引起细胞结构的变化，从而影响昆虫的正常生长发育和免疫相关功能。有研究表明：感染绿僵菌的大蜡螟幼虫的血细胞表面会形成囊泡(Sewify and Hashem, 2001)。经绿僵菌素 A 处理的大蜡螟浆细胞的形态和骨架表现为抑制粘附与扩散、阻止丝状伪足的形成及减少丝状肌动蛋白和微管的产生，并伴随着核固缩或损坏等(Vilcinskas *et al.*, 1997a, 1997b)。本研究通过相差显微形态观察发现：绿僵菌素诱导 SL-1 细胞凋亡一直同细胞增殖抑制相伴随。绿僵菌素 A 和 B 都能引起不同程度的细胞膜收缩，细胞变圆，细胞核膜损伤，出现凋亡小颗粒和空泡等细胞形态结构和骨架结构的破坏，使细胞粘附性变差，细胞不正常贴壁生长。这些现象都说明绿僵菌素诱导细胞增殖抑制和凋亡可能是导致昆虫生长发育受阻和死亡的重要原因之一。

细胞凋亡是指由外来因素触发细胞内预存的死亡程序而引起的细胞自主性死亡过程，是由特定基因调控的自主、有序性的死亡。能够显著加速或延缓细胞凋亡的高效天然产物都可能开发出新农药(钟国华等, 2008)。本研究应用荧光显微观察和流式细胞术，准确描述了绿僵菌素 A 和 B 都能够诱导 SL-1 细胞凋亡的典型特征变化和凋亡程度，其诱导细胞凋亡的荧光显微变化具有一定相似性，并且凋

亡的程度与绿僵菌素 A 和 B 毒性差异密切相关。

绿僵菌素诱导细胞增殖抑制和凋亡机制尚不清楚，其过程可能通细胞代谢、基因转录、细胞信号转导、细胞骨架形成等多种因素介导和参与。既可能是细胞对毒素诱导后的防御反应，亦可能是昆虫受绿僵菌感染后引起毒素扩散导致宿主组织细胞严重损伤的重要机制。此外，影响细胞周期和相关蛋白也是调控细胞增殖和凋亡的关键环节（李志琴和章静波，2002；Hou *et al*.，2004）。本研究证明：绿僵菌素 A 和 B 都能不同程度地引起 SL-1 细胞的增殖抑制、破坏细胞结构和诱导细胞凋亡，且具有细胞毒性的差异性和一致性，其作用机理有待于分子水平进一步研究。

参考文献（References）

Brousseau C, Charpentier G, Belloncik S, 1998. Effects of *Bacillus thuringiensis* and destruxins (*Metarhizium anisopliae* mycotoxins) combinations on spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 72: 262 – 268.

Chen HC, Chou CK, Sun CM, Yeh SF, 1997. Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Research*, 34: 137 – 144.

Dumas C, Ravallec M, Matha V, Vey A, 1996. Comparative study of the cytological aspects of the mode of action of destruxins and other peptidic fungal metabolites on target epithelial cells. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 137 – 146.

Hinaje M, Ford M, Banting L, Arkle S, Khambay K, 2002. An investigation of the ionophoric characteristics of destruxin A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 405: 73 – 77.

Hou YZ, Yang J, Zhao GR, Yuan YJ, 2004. Ferulic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin Ⅱ. *European Journal of Pharmacology*, 499: 85 – 90.

Hu QB, An XC, Jin FL, Freed S, Ren SX, 2009. Toxicities of destruxins against *Bemisia tabaci* and its natural enemy, *Serangium japonicum*. *Toxicon*, 53: 115 – 121.

Hu QB, Ren SX, 2004. Review of destruxins of *Metarhizium anisopliae* Sorokin. *Chinese Journal of Biological Control*, 20(4): 234 – 242. [胡琼波，任顺祥，2004. 绿僵菌素的研究进展. 中国生物防治，20(4)：234 – 242]

Hu QB, Ren SX, Liu SY, 2007. Purification of destruxins produced by *Metarhizium anisopliae* and bioassay of their insecticidal activities against grubs. *Acta Entomologica Sinica*, 50(5): 461 – 466. [胡琼波，任顺祥，刘树艳，2007. 绿僵菌素的分离制备及其对蛴螬的毒力. 昆虫学报，50(5)：461 – 466]

Hu QB, Ren SX, Wu JH, Chang JM, Musa PD, 2006. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. *Toxicon*, 48: 491 – 498.

Li ZQ, Zhang JB, 2002. The cell cycle and its regulation. *Progress in Physiological Sciences*, 33: 187 – 189. [李志琴，章静波，2002. 细胞周期及其调控. 生理科学进展，33：187 – 189]

Liu CM, Huang SS, Tzeng YM, 2004. Purification and quantitative analysis of destruxins from *Meterhizium anisopliae* by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 27 (6): 1013 – 1025.

Pedras MSC, Zaharia LI, Ward DE, 2002. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, 59: 579 – 596.

Pei FH, Cui LJ, Gao SL, 2007. Effects of sodium butyrate on cell growth inhibition and apoptosis in the human cell of gastric carcinoma. *Modern Oncology*, 15(7): 898 – 900. [裴凤华，崔路佳，高善玲，2007. 丁酸钠对人胃癌细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用机制研究. 现代肿瘤医学，15(7)：898 – 900]

Sewify GH, Hashem MY, 2001. Effect of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on cellular defence response and oxygen uptake of the wax moth *Galleria mellonella* L. (Lep., Pyralidae). *Journal of Applied Entomology*, 125: 533 – 536.

Sloman IS, Reynolds SE, 1993. Inhibition of ecdysteroid secretion from *Manduca* prothoracic glands *in vitro* by destruxins – cyclic depsipeptide toxins from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23: 43 – 46.

Sree KS, Padmaja V, Murth YLN, 2008. Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. *Pest Management Science*, 64: 119 – 125.

Sree KS, Sachdev B, Padmaja V, Bhatnagar RK, 2010. Electron spin resonance spectroscopic studies of free radical generation and tissue specific catalase gene expression in *Spodoptera litura* (Fab.) larvae treated with the mycotoxin, destruxin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97: 168 – 176.

Strasser H, Vey A, Butt TM, 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites or *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology*, 10: 717 – 735.

Thomsen L, Eilenberg J, 2000. Time-concentration mortality of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae from different destruxins. *Environmental Entomology of America*, 29: 1041 – 1047.

Vey A, Matha V, Dumas C, 2002. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *Journal of Invertebrate Pathology*, 80: 177 – 187.

Vilcinskas A, Matha V, Götz P, 1997a. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 43: 1149 – 1159.

Vilcinskas A, Matha V, Götz P, 1997b. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *Journal of Insect Physiology*, 43: 475 – 483.

Wang CY, Sheng RL, Jiang F, Ding XJ, 1998. A method: use of double fluorescent staining (AO/EB) to detect the morphology of cellular apoptosis. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 14(1): 104－106. [汪承亚，盛瑞兰，江凡，丁小健，1998. 吖啶橙/溴乙锭双荧光染色检测细胞凋亡的形态学方法. 中国病理生理杂志，14(1)：104－106]

Yoshimoto Y, Imoto M, 2002. Induction of EGF-dependent apotosis by vacuolar-type H^+-ATPase inhibitors in A431 cells overexpressing the EGF receptor. *Experimental Cell Research*, 279: 118－127.

Zhong GH, Shui KJ, Huang JF, Jia JW, Hu MY, 2008. Induction of apoptosis by botanical components in *Spodoptera litura* cultured cell line. *Acta Entomologica Sinica*, 51(4): 449－453. [钟国华，水克娟，黄劲飞，贾建文，胡美英，2008. 植物源物质诱导的斜纹夜蛾细胞凋亡. 昆虫学报，51(4)：449－453]

（责任编辑：赵利辉）